

**Untersuchung der Paraoxonaseaktivität,
ihrer Hemmung durch EDTA und ihrer
Reaktivierung durch Ca^{2+} bei Protein-
fraktionen verschiedener Spezies**

Diss. Erlangen 1983

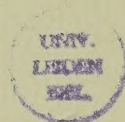
Vorgelegt

von

Ralph Görtler

aus

Nürnberg





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0109

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Untersuchung der Paraoxonaseaktivität,
ihrer Hemmung durch EDTA und ihrer
Reaktivierung durch Ca^{2+} bei Protein-
fraktionen verschiedener Spezies

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Ralph Görtler
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.1983

I. EINLEITUNG

II. VORWORT

III. STICHWORT

In Erinnerung

meiner lieben Mutter

gewidmet

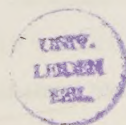
IV. ZUSATZ

V. ANHANG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. <u>EINLEITUNG</u>	5
II. <u>PROBLEMSTELLUNG</u>	20
III. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	28
1. Methodik	28
2. Präzision	35
3. Messung der Aktivität	35
4. Überprüfung der Hemmbarkeit des Enzyms mit EDTA	35
5. Untersuchung der Enzymreaktivie- rung durch Ca^{2+} - Zusatz	36
6. Messung der Aktivität der tiefge- frorenen Proteinfractionen	36
7. Untersuchung der Enzymreaktivie- rung durch Ca^{2+} - Zusatz der tief- gefrorenen Proteinfractionen	37
8. Untersuchungsergebnisse	38
IV. <u>DISKUSSION</u>	41
V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	44
VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	45



I. Einleitung

Für die Proteinfractionierung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Im folgenden werden die heute gebräuchlichsten Verfahren behandelt.

Zunächst wäre die Plasmaprotein-Fractionierung durch Gel-Filtration und Affinitäts-Chromatographie zu nennen. Unter der Methode der Gel-Filtration versteht man eine chromatographische Technik, welche auf der besonderen, charakteristischen sterischen Interaktion von Proteinen mit einem Gel-Medium beruht. Diese sterische Interaktion ist zurückzuführen auf Unterschiede in der Molekülgröße. Gel-Filtration kann entweder bei der Separation von Molekülen mit unterschiedlicher Molekülgröße, z. B. bei Entsalzungsprozessen oder bei der Fractionierung von Molekülen mit ungefähr ähnlicher Größe angewendet werden. Bei der sogenannten Affinitäts-Chromatographie handelt es sich um einen Prozeß, bei dem sich ein Protein reversibel an einen complementären Liganden bindet.

Eine andere Möglichkeit, Plasmaproteine zu fractionieren, stellt die sogenannte Jonen-Austausch-Chromatographie dar. Für die Gewinnung von Albumin, zum Teil auch für den Prothrombin-Komplex, wird häufig Cellulose (sogenannte DEAE-Sepharose) verwendet. Für die Jonen-Austausch-Chromatographie spielt es keine Rolle, welche Gerinnungshemmer bei der Blutabnahme verwendet wurden.

Die Jonen-Austausch-Chromatographie wird mit zwei säulenförmigen Apparaten durchgeführt (z. B. KS 370, 15 cm x 37 cm Ø Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden), die DEAE-Sephrose als Puffer enthalten. Die Geräte arbeiten bei Zimmertemperatur mit einer Wanderungsgeschwindigkeit von höchstens 20 cm/h.

Neben den Methoden der Gel-Filtration und Affinitäts-Chromatographie beziehungsweise der Jonen-Austausch-Chromatographie gibt es für die Fraktionierung von Proteinen als weitere prinzipielle Möglichkeit die Methode der Präzipitation. Die Präzipitation von Proteinen kann mit verschiedenen Verfahren erreicht werden.

Polson et al (1964) zeigten, daß Polyäthylenglykol mit einem Molekulargewicht von 7000 - 9000 für die Präzipitation von Plasmaproteinen bei Zimmertemperatur verwendet werden kann. Anders als Äthanol reagiert Polyäthylenglykol empfindlicher auf pH-Änderungen, wenn es als präzipitierendes Agens verwendet wird. Der Vorgang der Plasmaprotein-Präzipitation mit Polyäthylenglykol muß bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen ablaufen. Bei der Anwendung von Polyäthylenglykol für die Protein-Fraktionierung tritt nahezu kein Denaturierungseffekt auf.

Polson et al (1964) schlugen vor, lediglich für die

Fraktionierung von Fibrinogen, γ -Globulin, α -Globulin bzw. Albumin, Polyäthylenglykol als Präzipitans zu verwenden.

Die Präzipitation von Proteinen mit Hilfe von Salz, zum Beispiel Ammoniumsulfat, geht auf Hofmeister (1890) zurück. Er studierte als erster das Verhältnis zwischen Proteinlöslichkeit und Salzkonzentration. Ammoniumsulfat kann in hohen Konzentrationen verwendet werden und zeigt praktisch keinen schädigenden Effekt auf labile Proteine oder Enzyme. Die Fraktionierung mittels Ammoniumsulfat kann sehr mühsam sein, da die Präzipitation eines einzelnen Proteins in einer Proteinlösung nicht nur von der Präzipitationsfähigkeit dieser Proteinkomponente abhängt, sondern auch von der Konzentration. Ammoniumsulfat besitzt keine Pufferaktivität, man benötigt deshalb für den Präzipitationsvorgang einen geeigneten Puffer.

Ammoniumsulfat wird häufig auch bei Kristallisationsverfahren angewendet, zum Beispiel bei der Gewinnung von kristallisiertem Albumin.

Die Präzipitation mittels Ammoniumsulfat kann mit anderen Verfahren der Präzipitation, z. B. mit Rivanol, kombiniert werden.

Rivanol ist das Laktat von 2-Ethoxy-6,9-diamino-acridin. Es handelt sich um eine hellgelbe, organische Substanz, die leicht wasserlöslich ist.

Horejsi und Smetana (1956) benutzten als erste Rivanol für die Proteinfractionierung. In 3,5 Volumenanteilen einer 0,4 %-igen, wässrigen Rivanollösung gaben sie 1 Volumenanteil Plasma oder Serum. Die präzipitierten Protein-Rivanolkomplexe wurden getrennt und das zurückbleibende Reagenz wurde durch Adsorption mit Holzkohle entfernt. Horejsi und Smetana (1956) nahmen an, mit diesem Verfahren reines γ -Globulin in einem Arbeitsgang erhalten zu haben. Scheiffarth et al (1958) zeigten aber, daß durch das Rivanol-Präzipitationsverfahren mehrere Proteine gewonnen wurden, z. B. Transferrin, Hämoexin und vorzugsweise Serumcholinesterase.

Vor einigen Jahren beobachteten Chanutin und Curnish (1960) die Präzipitation von Plasmaproteinen durch kurzkettige Fettsäuren ($C_6 - C_{12}$) bei einem pH von 4,2. Unter Anwesenheit von Caprylsäure wurde γ -Globulin weniger präzipitiert als α - und β -Globulin. Für eine optimale Trennung von Proteinen durch Caprylsäure wird ein pH-Wert zwischen 4,8 und 5 benötigt. Ebenso wie die Präzipitation mit Rivanol sollte auch die Präzipitation mit Caprylsäure bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Der Ertrag der Proteine, die bei einem pH von 4,8 in Anwesenheit von Caprylsäure löslich bleiben, wird verbessert, wenn das zu fraktionierende Plasma vorher verdünnt wird. Optimale Bedingungen liegen vor, wenn das Plasma mit 2 Volumenanteilen 0,006 M

Acetat-Puffer (pH = 4) verdünnt wird. Caprylsäure kann auch als eine erste Reinigungsstufe für die Trennung von Coeruloplasmin, α_1 -Glycoprotein und Präalbumin verwendet werden. All diese Proteine lagern sich an der Oberfläche der Caprylsäure an und können dann durch einen chromatographischen Schritt weiter gereinigt werden.

Als Präzipitans unterscheidet sich Caprylsäure von Rivanol und Ammoniumsulfat dadurch, daß Protein-Fettsäure-Komplexe schwierig zu trennen sind.

Als Alternative zur Präzipitation von Proteinen mit Salz hat in den letzten Jahrzehnten Äthanol zunehmend an Bedeutung als organisches Präzipitans gewonnen (siehe "Methods of Plasma Protein Fractionation", edited by J. M. Curling, Academic Press 1980). Die Aufbereitung von reinen Proteinen aus komplexen Gemischen wird durch den Einfluß von verschiedenen Faktoren auf die präzipitierende Wirkung von Alkohol erleichtert; diese Faktoren sind: pH, Ionenstärke, Temperatur und Proteinkonzentration.

Äthanol bewirkt die Präzipitation von Proteinen hauptsächlich dadurch, daß er die dielektrische Konstante der wässrigen Lösung bedeutend senkt. Er ist das meist verwendete Fällungsmittel in der Großproduktion der wichtigsten Plasmaproteine, Albumin und Immunglobuline.

Zusätzlich zu der schon erwähnten niedrigen dielektrischen Konstante sollen die folgenden positiven Eigenschaften von Äthanol erwähnt werden:

- Mischbarkeit mit Wasser
- Senkung des Schmelzpunktes auf -22°C bei einer Konzentration von 32 % (w/w)
- keine Erzeugung von explosiven Gasgemischen bei normalen Raum- und Arbeitsbedingungen
- niedriges Molekulargewicht von nur 46 dalton
- stark flüchtig
- chemisch relativ inaktiv
- nicht stark giftig
- billig und leicht verfügbar.

Der Vorteil von Äthanol, der von höchster Wichtigkeit in einem Fraktionierungsprozeß ist, ist seine Hemmung von Bakterienwachstum und damit Bildung von Pyrogen. Diese Hemmung resultiert auch indirekt aus den niedrigen Temperaturen, die benötigt werden, wenn man mit Äthanol-Protein-Lösungen arbeitet.

E. J. Cohn und seine Mitarbeiter ersetzten 1946 die im allgemeinen verwendeten Salze durch Äthanol, als sie die Plasmafraktionierung im technischen Umfang entwickelten. Die logische Grundlage war, daß eine flüchtige Substanz leicht von den Proteinen unter milden Bedin-

gungen getrennt werden konnte. Dieser besondere Vorteil von Äthanol hat seine Bedeutung heute verloren (Friedli und Kistler, 1980).

Cohn und Mitarbeiter arbeiteten mit Äthanolkonzentrationen von 0 % bis 40 %; in ihren Veröffentlichungen wird die Äthanolkonzentration in "mole fractions" angegeben. Heute ist es verbreiteter, die Äthanolkonzentration in Prozent auszudrücken.

Es besteht kein Zweifel, daß Alkohol, selbst im am sorgfältigsten kontrollierten Prozeß, einen denaturierenden Effekt auf einige Proteine hat. Denaturierung, besonders von Lipoproteinen, ist oft irreversibel; sie kann zu einem völligen Verlust der physiologischen Funktionen eines Proteins führen oder sie kann strukturelle Veränderungen bewirken, die für die Aktivierung von Proenzymen oder die Bildung von neuen Determinanten mit Eigenschaften von Antigenen verantwortlich sind. Bei der Äthanolfraktionierung wird die Proteinlöslichkeit durch die Alkoholkonzentration begrenzt. Die Konzentrationen von Elektrolyten sind niedrig gehalten; die Wechselwirkungen der Salze mit den Proteinen hängen im wesentlichen vom Jonengehalt ab; die Eigenschaften der Proteine werden durch ihren Ionencharakter bestimmt.

Indem man eine sorgfältige Balance zwischen dem Jonengehalt und der Äthanolkonzentration beibehält, ist es möglich, die Löslichkeit einer Proteinkomponente in

weitem Umfang konstant zu halten, während die Löslichkeiten der anderen Komponenten variieren.

Die Plasmafraktionierung wird im "five parameter system" (pH, Ionenstärke, Temperatur, Protein- und Alkoholkonzentration) ausgeführt. Ungebundene, reine Proteine kann man nicht durch ein paar Präzipitationsschritte in guten Erträgen erhalten, wenn man Äthanol als Präzipitant im "five variable system" verwendet. Dasselbe trifft für andere nicht-spezifische Präzipitanten zu. Reine Fraktionen werden nur nach wiederholter Präzipitation in geringen Erträgen erhalten.

Fast 40 Jahre nach der bahnbrechenden Arbeit von E. J. Cohn und seinen zahlreichen Mitarbeitern, wird der größte Teil des Plasmas, das auf der ganzen Welt einem chemischen Prozeß unterworfen wird, immer noch nach den grundlegenden Alkoholmethoden fraktioniert. Cohn's methode 6 (1946), methode 9 (Oncley et al., 1949) und methode 10 (Cohn et al., 1950), sowie die Methode von Deutsch et al. (1946) haben viele Modifikationen von Forschern auf der ganzen Welt erfahren. Das Ziel der meisten Modifikationen war die wirtschaftliche Produktion von den wenigen Proteinen, in guten Erträgen, die in großen Mengen in der klinischen Praxis verwendet werden. Für den klinischen Gebrauch ist die absolute Reinheit der Proteine keine Notwendigkeit.

Einige Jahre nachdem Cohn's Arbeit veröffentlicht war, stellten Nitschmann und Kistler (1954, 1962) ein modifiziertes Verfahren vor; dieses Verfahren verbessert die Erträge von Albumin und γ -Globulinen.

Zusätzlich kann der Alkoholverbrauch von etwa 2000 l pro 1000 l Plasma bei Cohn's kombinierten Methoden 6 und 9 auf etwa 1200 l pro 1000 l Plasma reduziert werden.

Die größten zu behandelnden Volumina werden auch vom etwa 2,2-fachen auf das 1,7-fache des Ausgangsvolumen reduziert.

Die annähernde Verteilung von Proteinen unter den verschiedenen Fraktionen wird in den beiden folgenden Tabellen 1 und 2 gezeigt:

Tabelle 1: Verteilung von Plasmaproteinen in den einzelnen Fraktionen, die man durch die Methode Nr. 6 von Cohn (1946) erhält.

Fraktion	Annähernder Protein- gehalt (in Prozent)	Komponenten
I	5 - 10	Fibrinogen Gerinnungsfaktor VIII Clq, C1r, C1s kalt-unlösliches Globulin
II + III	25	γ -Globuline: IgG, IgA, IgM Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X α - und β -Globuline
IV-1	5 - 10	α - und β -Globuline α_1 -Antitrypsin IgM, Antithrombin III Complement-Anteile
IV-4	5 - 10	α - und β -Globuline Ceruleplasmin Haptoglobin Transferrin
V	50 - 60	Albumin α - und β -Globuline

Tabelle 2: Verteilung von Plasmaproteinen in den einzelnen Fraktionen, die man durch die Methode von Kistler und Nitschmann (1962) erhält.

Fraktion	Annähernder Protein- gehalt in der Frak- tion (in Prozent)	Komponenten
I	5 - 10	Fibrinogen Gerinnungsfaktor VIII Clq, C1r, C1s kalt-unlösliches Globulin
Präzipitat B	20	α - und β -Globuline Plasminogen Ceruleplasmin Gerinnungsfaktor II, VII, IX, X IgM
Präzipitat "IV"	10 - 15	α - und β -Globuline Transferrin Transcobalamin Ceruleplasmin Albumin
Präzipitat C	50	Albumin α - und β -Globuline Wachstumsgonadotropin
Präzipitat GG	10	γ - Globuline IgG (IgA) α - und β -Globuline Albumin

Die Fraktionierungsprozesse, denen heute am häufigsten gefolgt wird - manchmal mit gewissen Modifikationen, um den örtlichen Gegebenheiten zu entsprechen - sind in den folgenden Abbildungen 1 - 4 wiedergegeben:

Abbildung 1: Methode 6
(Cohn et al., 1946)

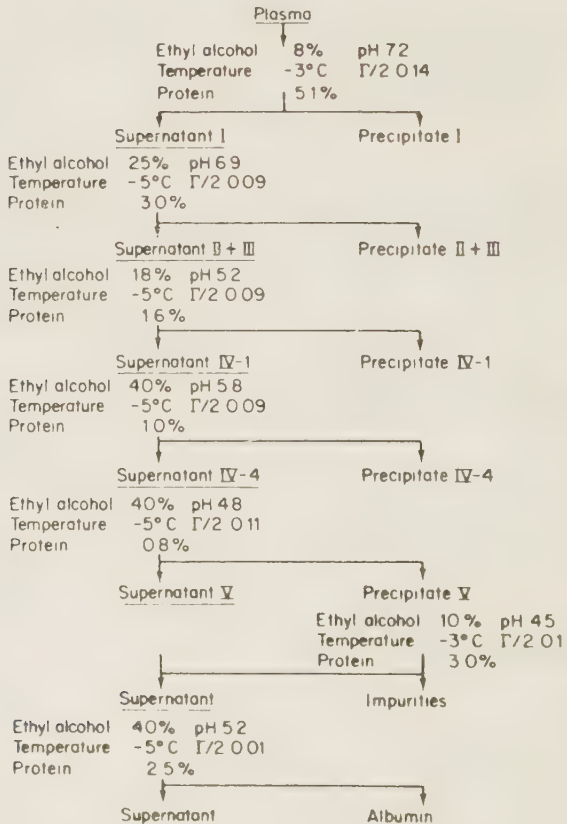


Abbildung 2: Methode 9
(Oncley et al., 1949)

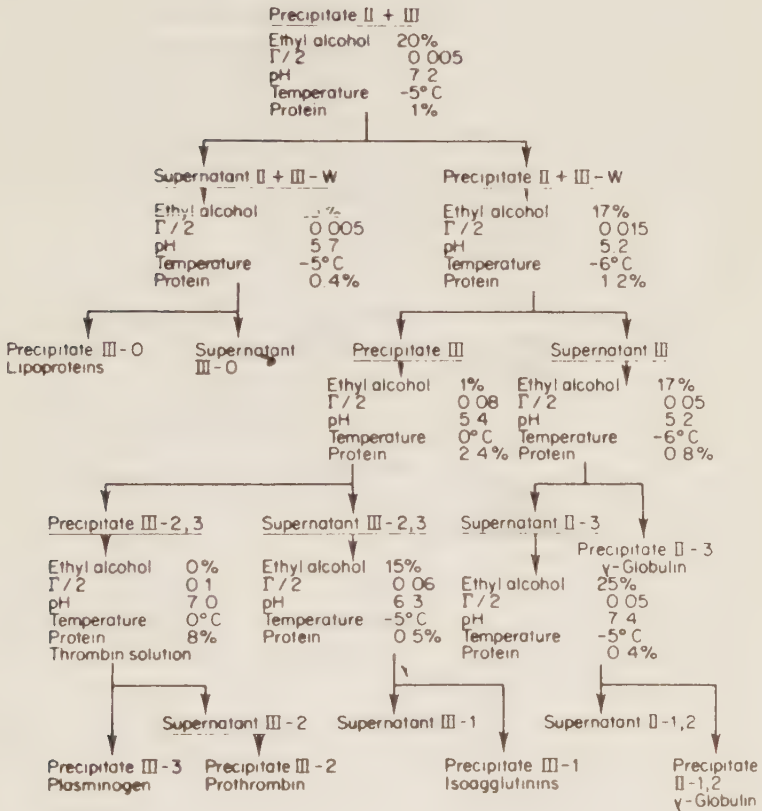


Abbildung 3: Herstellung von Albumin aus Plasma
(Kistler und Nitschmann, 1962)

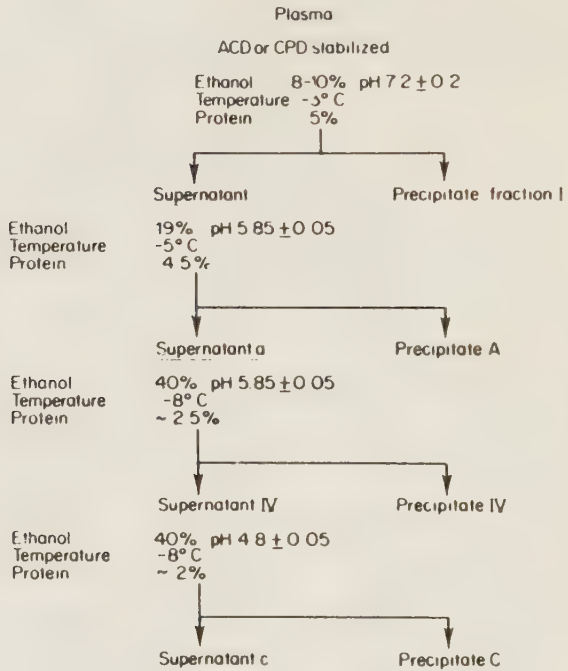
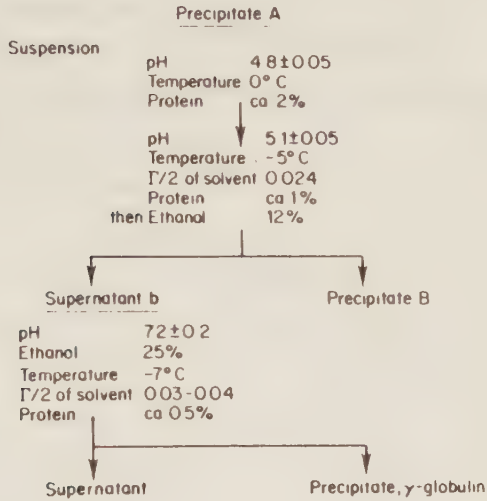


Abbildung 4: Umwandlung von Präzipitat A zu γ -Globulin
(Kistler und Nitschmann, 1962)



II. Problemstellung

Schon Aldrige (1953) konnte im Serum vieler Warmblüter die Existenz eines Enzyms nachweisen, welches in der Lage ist, Paraoxon hydrolytisch zu spalten.

Als nicht empfohlene Bezeichnung findet sich hierfür in der gültigen Enzymnomenklatur (1972) der Name "Paraoxonase". Empfohlen wird die Bezeichnung Arylester-Hydrolase, Arylesterase E.C.3.1.1.2.

Dieses Enzym spaltet Phenylacetat in Phenol und Essigsäure. Die Paraoxonase ist ein auch im menschlichen Serum vorkommendes Enzym.

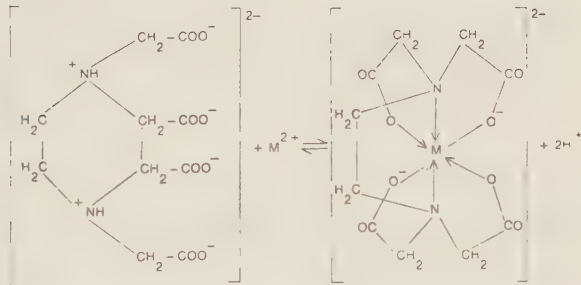
Krisch (1968) konnte in einer Arbeit über die enzymatische Hydrolyse von E 600 durch menschliches Serum zeigen, daß Ca^{2+} für die Aktivität der menschlichen Serumparaoxonase nötig ist. Er konnte eine Aktivitätssteigerung durch Ca^{2+} von etwa 40 % zeigen.

Krisch (1968) untersuchte auch die Empfindlichkeit der Serumparaoxonase gegenüber verschiedenen Inhibitoren; dabei hob er besonders die Chelatbildner, vor allem EDTA hervor.

Diese Hemmbarkeit durch EDTA ließ an eine Abhängigkeit der Esterase von Ca^{2+} denken, wobei bei Zugabe von EDTA letzteres als Ca^{2+} - Fänger fungiert.

In alkalischer Lösung bildet EDTA mit zweifach positiv geladenen Kationen einen 1:1 Komplex, wobei 2 H^+ - Ionen frei werden (Jander, Blasius, 1973), wie die folgende Abbildung 5 zeigt.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bildung eines EDTA-Komplexes.



Auch Marton und Kalow berichteten 1960 über die Hemmung eines Enzyms durch EDTA, das wohl mit der Paraoxonase identisch ist. Hierbei blockierte EDTA in einer Konzentration von 5×10^{-5} M die Aktivität des Enzyms vollständig. Die durch EDTA blockierte Aktivität konnte durch Zufuhr von verschiedenen zweiwertigen Metallionen wiederhergestellt werden.

Krisch (1968) stellte eine Hemmbarkeit der Aktivität bei einer Konzentration von 1×10^{-3} M EDTA um 45 %, bei einer Konzentration von 1×10^{-4} M EDTA um 53 % fest.

Die Veränderung der Hemmbarkeit der Aktivität in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration beschrieben auch Erdös, Debay und Westerman (1959).

Erdös, Debay und Westerman (1960) fanden, daß die Fraktion IV-I des menschlichen Plasmas ein Enzym enthielt, welches ähnliche Eigenschaften zeigte, wie die menschliche Serumarylesterase.

In Versuchen mit verschiedenen Inhibitoren und Aktivatoren erzielten Erdös, Debay und Westerman (1960) annähernd dieselben Resultate für menschliche Serumarylesterase und das Enzym in Fraktion IV-I.

Hierbei wurde die Aktivität mit EDTA in einer Konzentration von 5×10^{-5} M gehemmt. Zur Reaktivierung des

Enzyms wurde 1×10^{-4} M CaCl_2 hinzugefügt.

Hechtel (1980) konnte an je 5 westdeutschen Personen mit niedriger, mittlerer und hoher Paraoxonaseaktivität bestätigen, daß bei einer Konzentration von 10^{-3} M EDTA im Meßansatz nach Krisch (1968) ein Abfall der Paraoxon hydrolysierenden Aktivität auf einen mit EDTA nicht hemmbaren Anteil von etwa 20 - 45 U/l eintritt.

Hieronimus (1981) fand, daß die mit EDTA-Zusatz gemessenen Serumproben vietnamesischer Probanden Paraoxonaserestaktivitäten zwischen 5 und 55 U/l lieferten.

Omuro (1980) zeigte an 35 Sera japanischer Probanden aller Aktivitätstypen eine Hemmbarkeit der Paraoxonaseausgangsaktivität durch EDTA auf 2-35 U/l Restaktivität.

Aufgrund von Dialyse-Studien konnten Erdös, Debay und Westerman (1960) ebenfalls die Abhängigkeit des Enzyms von Calcium nachweisen.

In spektrophotometrischen Studien konnten Erdös, Debay und Westerman (1960) weiter Spuren einer Arylesteraseaktivität an der Proteinoberfläche in den Fraktionen III und III-O nachweisen.

Erdös und Boggs (1961) fanden, daß auch Humanalbumin (sowohl Fraktion V, als auch kristallisiert) Paraoxon hydrolysierte.

Analoge Beobachtungen machten auch Skrinjaric-Spoljar und Reiner (1968).

Sie fanden neben dem Hauptanteil einer Aktivität in Fraktion IV-1, auch einen geringeren Anteil an Aktivität in Fraktion V des menschlichen Plasmas.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, in wie weit Proteinfraktionen der verschiedenen Spezies eine Paraoxonaseaktivität besitzen. Ferner war zu prüfen, in wie weit diese Aktivität durch EDTA hemmbar war und durch Ca^{2+} - Zusatz reaktiviert werden konnte. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich bei der Aktivitätsbestimmung beziehungsweise der Untersuchung über die Enzymreaktivierung ein Unterschied ergab zwischen der sofortigen Verwendung von hergestellten Lösungen der Proteinfraktionen und der Verwendung von Lösungen der Proteinfraktionen, die über einen längeren Zeitraum tiefgekühlt lagerten.

Geprüft wurde dies an folgenden menschlichen Cohn-Fraktionen, die nach Auskunft der Herstellerfirma nach Methode 6 (Cohn et al., 1946) aus Oxalatplasma hergestellt wurden:

1) Fraktion II.

Lot.-Nr.: 118316 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 97 % γ -Globulin

2) Fraktion III.

Lot.-Nr.: 018314 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 17,7 % α_2 -Globulin

61,6 % β -Globulin

20,7 % γ -Globulin

3) Fraktion III-0.

Lot.-Nr.: 118346 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 12 % Albumin

51 % Globulin

37 % β -Globulin

4) Fraktion IV-1.

Lot.-Nr.: 018344 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 42 % α -Globulin

24,6 % β -Globulin

33,3 % Albumin

5) Fraktion IV-4.

Lot.-Nr.: 018312 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 40 % α -Globulin

34 % β -Globulin

26 % Albumin

6) Fraktion V.

Lot.-Nr.: 018342 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 95 % Humanalbumin

Weiterhin wurden für diese Untersuchung die folgenden menschlichen Cohn-Fraktionen herangezogen, welche ebenfalls nach Methode 6 (Cohn et al., 1946) jedoch aus Heparinplasma ohne Zusatz von Ca^{2+} - komplexierenden Gerinnungshemmern hergestellt wurden:

7) Fraktion II + III.

Lot.-Nr.: 118888 (von P.L Biochemicals Inc.)

8) Fraktion IV₁,

Lot.-Nr.: 118888 (von P.L Biochemicals Inc.)

9) Fraktion IV₄,

Lot.-Nr.: 118888 (von P.L Biochemicals Inc.)

10) Fraktion V.

Lot.-Nr. 118888 (von P.L Biochemicals Inc.)

Ferner wurden die folgenden tierischen Cohn-Fraktionen geprüft, welche nach Mitteilung des Herstellers nach Methode 6 (Cohn et al., 1946) aus Serum hergestellt wurden:

11) Fraktion IV-1. vom Schwein.

Lot.-Nr. 018352 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 9 % α_1 -Globulin

54 % α_2 -Globulin

5 % β -Globulin

15 % Albumin

12) Fraktion IV-1. vom Hasen.

Lot.-Nr.: 118364 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 33,8 % α_2 -Globulin

30,1 % β -Globulin

21,5 % γ -Globulin

14,6 % Albumin

13) Fraktion V. vom Hasen.

Lot.-Nr.: 118362 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 90 % Hasenalbumin

Schließlich wurden noch folgende kristallisierte Albumine überprüft:

14) 1-fach kristallisiertes Humanalbumin.

Lot.-Nr.: 118310 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 99 % Humanalbumin

15) 2-fach kristallisiertes Albumin vom Hasen.

Lot.-Nr.: 202238 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 95 % Hasenalbumin

16) 5-fach kristallisiertes Albumin vom Ei.

Lot.-Nr.: 830018 (von P.L Biochemicals Inc.)

enthaltend: 99 % Eier-Albumin

III. Eigene Untersuchungen

1. Methodik

Zur Bestimmung der Aktivität der Paraoxonase der geprüften Fraktionen wurde der photometrische Test nach Krisch (1968) herangezogen.

Dieser Test mißt die Abspaltung von p-Nitrophenol aus Paraoxon (E 600).

a) Reagenzien:

1. 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2)
2. Glycin-EDTA-NaOH-Puffer (pH 11,2)
3. Tris-HCl-Puffer (pH 8)
4. E 600-Stammlösung
5. E 600-Gebrauchslösung
6. 0,9 %-ige NaCl-Lösung
7. physiologische Kochsalzlösung in 0,1 M CaCl_2 -Lösung

b) Herstellung der Reagenzien:

Glycin-NaOH-Puffer (pH 11,2):

Man wiegt 3,784 g Glycin und 2,945 g NaCl ab, löst beides zusammen in ca. 850 - 900 ml H₂O bidest.; mit 1,0-N NaOH (40,0 g NaOH ad 1,00 l H₂O bidest.) wird der pH-Wert auf 11,2 eingestellt.

Nach dieser pH-Einstellung wird auf fast 1,00 l mit H₂O bidest. aufgefüllt, die Pufferlösung auf 20 $\pm$ 1° C gebracht, der pH-Wert kontrolliert und eventuell korrigiert, anschließend wird auf 1,00 l mit H₂O bidest. aufgefüllt.

Glycin-EDTA-Puffer (pH 11,2):

Um einen Glycin-Puffer herzustellen, der 10⁻³ molar an EDTA (Anion der Äthylendinitrilotetraessigsäure) ist, verfährt man wie bei der Bereitung des Glycin-NaOH-Puffers, wiegt aber neben Kochsalz und Glycin auch noch 292 mg Äthylendinitrilotetraessigsäure ein.

TRIS-HCl-Puffer (pH 8):

In 850 - 900 ml H₂O bidest. löst man 12,11 g "TRIS" und stellt dann mit 1,0-N HCl auf pH = 8 mittels pH-Meter ein. Auffüllen des Puffers auf 1,0 l mit H₂O bidest.

E 600-Stammlösung:

0,26 ml E 600 ad 100 ml TRIS-Puffer, einige Minuten Verweildauer im Ultraschallbad, danach kräftig schütteln.

E 600-Gebrauchslösung:

Verdünnung der Stammlösung 1:5 mit aqua dest.

0,9 %-ige NaCl-Lösung:

Auflösen von 9 g NaCl in 1,00 l H₂O bidest.

0,9 %-ige NaCl-Lösung in 0,1 M CaCl₂:

In 750 - 800 ml physiologischer Kochsalzlösung wird zusätzlich 0,1 M CaCl₂ = 11,0986 g CaCl₂ hinzugegeben. Anschließend wird auf 1,00 l mit H₂O bidest. aufgefüllt.

c) Lösen der Cohn-Fraktionien:

Von allen Fraktionen wurden 5 %-ige Lösungen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, z. B. wurden 0,1 g in 2 ml 0,9 %-ige NaCl-Lösung gegeben. Dabei zeigte sich folgende Situation:

Nach 1 - 3 Stunden waren bei 24° C Raumtemperatur folgende Fraktionen gut gelöst:

Von den menschlichen Cohn-Fraktionen, die aus Oxalatplasma hergestellt wurden:

- 1) γ -Globulin, Cohn-Fraktion II
- 3) β -Lipoprotein, Cohn-Fraktion III-0
- 4) α -Globulin, Cohn-Fraktion IV-1
- 5) α -Globulin, Cohn-Fraktion IV-4
- 6) Humanalbumin, Cohn-Fraktion V

Von den menschlichen Cohn-Fraktionen, die aus Heparinplasma hergestellt wurden:

- 8) Cohn-Fraktion IV₁
- 10) Cohn-Fraktion V

Von den tierischen Cohn-Fraktionen, die aus Serum hergestellt wurden:

- 11) α -Globulin, Cohn-Fraktion IV-1, vom Schwein
- 12) α -Globulin, Cohn-Fraktion IV-1, vom Hasen
- 13) Albumin, Cohn-Fraktion V, vom Hasen

Von den kristallisierten Albuminen:

- 14) 1-fach kristallisiertes Humanalbumin
- 15) 2-fach kristallisiertes Albumin vom Hasen

Die folgenden Fraktionen waren bei 24° C Raumtemperatur nach 8 Stunden unvollständig gelöst:

Von den menschlichen Cohn-Fraktionen, die aus Oxalatplasma hergestellt wurden:

2) β -Globulin, Cohn-Fraktion III

Von den menschlichen Cohn-Fraktionen, die aus Heparinplasma hergestellt wurden:

7) Cohn-Fraktion II + III

9) Cohn-Fraktion IV₄

Von den kristallisierten Albuminen:

16) 5-fach kristallisiertes Eier-Albumin

Sie wurden deshalb weiter 17 Stunden lang bei 37° C in ein Wasserbad gestellt, anschließend 5 Minuten lang bei 1000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Daraus resultierte eine weitgehend vollständige Lösung.

Zur Messung wurden die 5 %-igen Lösungen der Fraktionen 1:5 verdünnt, und zwar einerseits mit einfacher physiologischer Kochsalzlösung, andererseits mit physiologischer Kochsalzlösung, die zusätzlich noch 0,1 M CaCl₂ enthielt.

d) Meßansatz:

Für die Messung der Aktivität wurden in ein Reagenzglas pipettiert:

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer
0,25 ml 1:5 Verdünnung der 5 %-igen
Lösungen der Fraktionen mit 0,9 %-iger
NaCl-Lösung
0,5 ml E 600-Gebrauchslösung

Für die Überprüfung der Hemmbarkeit wurden in ein Reagenzglas pipettiert:

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer mit EDTA
0,25 ml 1:5 Verdünnung der 5 %-igen
Lösungen der Fraktionen mit 0,9 %-iger
NaCl-Lösung
0,5 ml E 600-Gebrauchslösung

Für die Messung der Reaktivierung wurden in ein Reagenzglas pipettiert:

1,65 ml Glycin-NaOH-Puffer
0,25 ml 1:5 Verdünnung der Fraktionen
mit physiologischer Kochsalzlösung, die
zusätzlich noch 0,1 M CaCl_2 enthielt
0,5 ml E 600-Gebrauchslösung

Nach Durchmischen der Lösungen im Reagenzglas wurde ein Teil davon in eine Küvette der Schichtdicke 1 cm gegeben.

e) Messung:

30 Sekunden und 180 Sekunden nach Starten der Reaktion durch die Zugabe von E 600 wurde bei der Wellenlänge 405 nm, Temperatur 25°C, die Extinktion des durch Hydrolyse freigesetzten p-Nitrophenol abgelesen. Die Probe wurde gegen den unter gleichen Bedingungen gemessenen Leerwert (mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung statt 5-%iger Lösung der Fraktionen) gemessen. Ausgewertet wurde die Extinktionsdifferenz 180 Sekunden minus 30 Sekunden.

f) Berechnung:

Zur Umrechnung der Extinktionsdifferenzen in nMol wird der molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol (in Glycin-NaOH-Puffer pH 11,2) $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18,05 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{Mol}^{-1}$ zugrundegelegt. 10 nMol p-Nitrophenol gelöst in 1 ml hätten danach (bei $d = 1 \text{ cm}$ und $\lambda = 405 \text{ nm}$) eine Extinktion von 0,1805. Unter weiterer Berücksichtigung der Serumverdünnung (Umrechnung auf ml Serum durch Multiplikation mit 20), der Meßzeit (Umrechnung auf eine Minute durch Division durch 2,5) und des Ansatzvolumens errechnet sich die Aktivität nach folgender Formel:

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta E \times 10 \times 2,4 \times 20}{0,1805 \times 2,5} = \Delta E \times 1063 \text{ (U/l)}$$

2. Präzision

In der vorliegenden Arbeit lag die Präzision der durchgeführten Messungen bei 2,8 % (Variationskoeffizient).

3. Messung der Aktivität

Die hergestellten 5 %-igen Lösungen der Fraktionen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung 1:5 verdünnt. Anschließend wurde unmittelbar nach Verdünnung mit Glycin-Puffer die Paraaxonase-Aktivität gemessen.

Die Ergebnisse sind in Spalte 1 der Tabelle 3 zusammengestellt.

4. Überprüfung der Hemmbarkeit des Enzyms mit EDTA

Die folgenden Messungen wurden unter denselben Bedingungen wie vorher gemessen. Anstelle von Glycin-Puffer wurde jedoch Glycin-EDTA-Puffer verwendet, um die Hemmbarkeit zu überprüfen.

Die Ergebnisse sind in Spalte 2 der Tabelle 3 zusammengestellt.

5. Untersuchung der Enzymreaktivierung durch
 Ca^{2+} - Zusatz

Die hergestellten 5 %-igen Lösungen der Fraktionen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung, die zusätzlich 0,1 M CaCl_2 enthielt, 1:5 verdünnt. Anschließend wurde nach Verdünnung mit Glycin-Puffer die Aktivität gemessen.

Die Ergebnisse sind in Spalte 3 der Tabelle 3 dargestellt.

6. Messung der Aktivität nach 96 Stunden tiefgekühlter Aufbewahrung (bei -25°C) der 5 %-igen Lösungen der Fraktionen

Die Lösungen wurden 96 Stunden bei -25°C gelagert, aufgetaut und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung 1:5 verdünnt. Dann erfolgte mit Glycin-Puffer die Aktivitätsmessung.

Die Ergebnisse sind in Spalte 4 der Tabelle 3 dargestellt.

7. Untersuchung der Enzymreaktivierung durch Ca^{2+} - Zusatz bei den über 96 Stunden tiefgekühlt (bei $- 25^{\circ} \text{C}$) aufbewahrten 5 %-igen Lösungen der Fraktionen

Die über 96 Stunden tiefgefrorenen (bei $- 25^{\circ} \text{C}$) Fraktionslösungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung, die zusätzlich $0,1 \text{ M CaCl}_2$ enthielt, 1:5 verdünnt. Danach erfolgte mit Glycin-Puffer die Messung der Aktivität.

Die Ergebnisse sind in Spalte 5 der Tabelle 3 dargestellt.

Für die Erstellung der Spalten 1 - 5 in Tabelle 3 wurde die in der Problemstellung aufgeführte Reihenfolge der verschiedenen Proteinfractionen berücksichtigt:

Tabelle 3: Untersuchungsergebnisse

Fraktion	<u>Spalte 1:</u>		<u>Spalte 2:</u>	
	Enzymaktivität in U/l		Enzymhemmung mit EDTA gemessen in U/l	
1) Cohn II (aus Oxalatplasma)	0		0	
2) Cohn III (aus Oxalatplasma)	0		0	
3) Cohn III-0 (aus Oxalatplasma)	0		0	
4) Cohn IV-1 (aus Oxalatplasma)	0		0	
5) Cohn IV-4 (aus Oxalatplasma)	0		0	
6) Cohn V (aus Oxalatplasma)	4,3		8,0	
7) Cohn II + III (aus Heparinplasma)	3,2		0	
8) Cohn IV ₁ (aus Heparinplasma)	124,9		0	
9) Cohn IV ₄ (aus Heparinplasma)	0		0	
10) Cohn V (aus Heparinplasma)	24,9		24,1	
11) Cohn IV-1, vom Schwein (aus Serum)	0		0	
12) Cohn IV-1, vom Hasen (aus Serum)	119,6		0	
13) Cohn V, vom Hasen (aus Serum)	9,1		14,3	
14) 1 x kristallisiertes Humanalbumin	2,7		8,0	
15) 2 x kristallisiertes Hasenalbumin	3,2		2,7	
16) 5 x kristallisiertes Eieralbumin	0		0	

Tabelle 3: Untersuchungsergebnisse (Fortsetzung)

Fraktion	<u>Spalte 3:</u>		<u>Spalte 4:</u>	
	Enzymreaktivierung mit Ca ²⁺ gemessen in U/l		Enzymaktivität der gefrorenen Fraktionen gemessen in U/l	
1) Cohn II (aus Oxalatplasma)	6,5		0	
2) Cohn III (aus Oxalatplasma)	0		0	
3) Cohn III-0 (aus Oxalatplasma)	20,7		0	
4) Cohn IV-1 (aus Oxalatplasma)	2,6		0	
5) Cohn IV-4 (aus Oxalatplasma)	15,9		0	
6) Cohn V (aus Oxalatplasma)	21,3		5,3	
7) Cohn II + III (aus Heparinplasma)	37,2		2,7	
8) Cohn IV ₁ (aus Heparinplasma)	224,3		118,5	
9) Cohn IV ₄ (aus Heparinplasma)	17,0		0	
10) Cohn V (aus Heparinplasma)	60,0		23,4	
11) Cohn IV-1, vom Schwein (aus Serum)	8,0		0	
12) Cohn IV-1, vom Hasen (aus Serum)	332,7		125,4	
13) Cohn V, vom Hasen (aus Serum)	15,9		7,9	
14) 1 x kristallisiertes Humanalbumin	18,6		3,2	
15) 2 x kristallisiertes Hasenalbumin	6,4		4,8	
16) 5 x kristallisiertes Eialbumin	0		0	

Tabelle 3: Untersuchungsergebnisse (Fortsetzung)

Fraktion	<u>Spalte 5:</u>	
	Enzymreaktivierung mit Ca^{2+} der gefrorenen Fraktionen gemessen in U/l	
1) Cohn II (aus Oxalatplasma)	4,3	
2) Cohn III (aus Oxalatplasma)	0	
3) Cohn III-0 (aus Oxalatplasma)	20,2	
4) Cohn IV-1 (aus Oxalatplasma)	2,1	
5) Cohn IV-4 (aus Oxalatplasma)	14,9	
6) Cohn V (aus Oxalatplasma)	15,9	
7) Cohn II + III (aus Heparinplasma)	37,2	
8) Cohn IV ₁ (aus Heparinplasma)	233,3	
9) Cohn IV ₄ (aus Heparinplasma)	15,4	
10) Cohn V (aus Heparinplasma)	59,2	
11) Cohn IV-1, vom Schwein (aus Serum)	8,5	
12) Cohn IV-1, vom Hasen (aus Serum)	323,7	
13) Cohn V, vom Hasen (aus Serum)	14,4	
14) 1 x kristallisiertes Humanalbumin	14,3	
15) 2 x kristallisiertes Hasenalbumin	5,3	
16) 5 x kristallisiertes Eialalbumin	0	

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, welche der Cohn-Fraktionen verschiedener Spezies eine Paraoxonasaktivität besitzen und in wie weit die Enzymaktivität durch Ca^{2+} - Zusatz aktiviert oder durch EDTA-Zusatz gehemmt werden kann. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich ein Unterschied ergab zwischen der sofortigen Verwendung von hergestellten Lösungen der Proteinfraktionen und der Verwendung von Lösungen der Proteinfraktionen, die über einen längeren Zeitraum tiefgekühlt lagerten.

Als Ergebnis der Untersuchung kann festgehalten werden, daß 2-fach kristallisiertes Albumin vom Hasen eine äußerst geringe Aktivität besitzt. Ebenfalls sehr geringe Aktivitäten zeigen das Albumin vom Hasen, Cohn-Fraktion V, weiter Humanalbumin, Cohn-Fraktion V, weiter 1-fach kristallisiertes Humanalbumin und schließlich menschliches Heparinplasma ohne Zusatz von Ca^{2+} - komplexierenden Gerinnungshemmern, Cohn-Fraktion II + III.

Höhere Aktivität zeigen nur das α -Globulin vom Hasen, Cohn-Fraktion IV-1 und die Cohn-Fraktion IV₁ des menschlichen Heparinplasmas ohne Ca^{2+} - komplexierenden Gerinnungshemmer.

Alle übrigen Fraktionen zeigten keine meßbare Aktivität. Interessanterweise zeigte die Cohn-Fraktion IV-1 vom Hasen eine Aktivität von 119,6 U/l, während dieselbe Fraktion vom Schwein keine Aktivität zeigte.

Erdös, Debay und Westerman (1960), sowie Erdös, Boggs (1961) und Skrinjaric-Spoljar, Reiner (1968) beschrieben eine Aktivität in Fraktion IV-1 des menschlichen Plasmas. In der vorliegenden Untersuchung konnte dies nur unter Ca^{2+} - Zusatz in äußerst geringem Maße gezeigt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse aus Spalte 1 und 2 der Tabelle 3, so zeigt sich, daß die sehr geringen Aktivitäten des 2-fach kristallisierten Hasenalbumins, der Cohn-Fraktion V vom Hasen, der Cohn-Fraktion V vom Menschen, des 1-fach kristallisierten Humanalbumins und der Cohn-Fraktion V, Methode 6 des Humanserums, praktisch durch die im Meßansatz vorhandene EDTA-Konzentration von 1×10^{-3} M nicht gehemmt wurde. In diesem Zusammenhang erwiesen sich lediglich die Enzymaktivitäten der Cohn-Fraktion IV-1 des Hasens und die Fraktion IV₁ des Humanserums als deutlich hemmbar.

Vergleichen wir die Spalte 1 und die Spalte 4 der Tabelle 3, so zeigen die Ergebnisse, daß die Enzymaktivitäten der Fraktionen nahezu unverändert bleiben. Dies, obwohl in einem Falle die 5 %-igen Lösungen der Fraktionen tiefgekühlt (bei -25°C) über 96 Stunden aufbewahrt wurden.

Omuro (1980) konnte bereits zeigen, daß keine auffälligen Aktivitätsunterschiede zwischen den nicht eingefrorenen und den für einige Tage eingefrorenen Sera bestanden.

Eine Aktivierung des Enzyms unter Ca^{2+} - Zusatz in der Konzentration von $1 \times 10^{-1}\text{ M}$ konnte bei der Mehrzahl der Fraktionen gefunden werden. Die Aktivitätssteigerung betrug beispielsweise bei der Cohn-Fraktion IV-1 vom Hasen weit über das Doppelte; die Aktivität der Cohn-Fraktion II + III des Humanserums stieg sogar auf über das 10-fache. Lediglich das 5-fach kristallisierte Eier-Albumin und β -Globulin, Cohn-Fraktion III des Menschen blieben durch Ca^{2+} - Zusatz unbeeinflusst (Vergleich der Spalten 1 und 5 der Tabelle 3).

V. Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß einige Cohn-Fractionen verschiedener Spezies eine Paraoxonaseaktivität besitzen. Die Enzymaktivität konnte unter Ca^{2+} - Zusatz in der Konzentration von 1×10^{-1} M gesteigert werden, in einem Fall sogar auf über das 10-fache.

Eine deutliche Hemmung des Enzyms mit Hilfe von EDTA in einer Konzentration von 1×10^{-3} M war nur bei der Cohn-Fraktion IV-1 vom Hasen und der menschlichen Cohn-Fraktion IV₁, hergestellt ohne Zusatz von Gerinnungshemmern, möglich.

Die vorhandenen Enzymaktivitäten der anderen Fraktionen waren durch EDTA praktisch nicht hemmbar.

Es ist nicht ausschlaggebend, ob die Lösungen der Fraktionen jeweils vor der Messung neu hergestellt werden oder ob einmal hergestellte Fraktionslösungen tiefgekühlt über einen längeren Zeitraum aufbewahrt wurden.

VI. Literaturverzeichnis

1. ALDRIGE, W. N.:

Serum esterases. An enzyme hydrolysing p-nitro-phenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953)

2. CHANUTIN, A. and CURNISH, R. R.:

The Precipitation of Plasma Proteins by Short-Chain Fatty Acids.

Arch. Biochem. Biophys. 39, 218 - 220 (1960)

3. COHN, E. J., STRONG, L. E.:

Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids.

J. Am. Chem. Soc. 68, 459 - 475 (1946)

4. COHN, E. J., GURD, F. R. N.:

Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma.

J. Am. Chem. Soc. 72, 465 - 474 (1950)

5. DEUTSCH, H. F., GOSTING, L. J.:

Biophysical Studies of Blood Plasma Proteins.

J. Biol. Chem. 164, 109 - 118 (1946)

6. ENZYME NOMENCLATURE:

Recommendations (1972) of the International Union
of Pure and Applied Chemistry and the International
Union of Biochemistry.

Elsevier, Amsterdam (1973)

7. ERDÖS, E. G., DEBAY, C. R., WESTERMAN, M. P.:

Activation and inhibition of the arylesterase of
human serum.

Nature 184, 430 (1959)

8. ERDÖS, E. G., DEBAY, C. R., WESTERMAN, M. P.:

Arylesterases in blood: Effect of calcium and
inhibitors.

Biochem. Pharmacol. 2, 173 (1960)

9. ERDÖS, E. G., BOGGS, L. E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

Nature 190, 716 (1961)

10. FRIEDLI, H., KISTLER, P.:

Ethanol Precipitation.

Methods of Plasma Protein Fractionation

edited by J. M. Curling, Academic Press (1980)

11. HECHTEL, R.:

Die Hemmung der menschlichen Serum Paraoxonase
durch EDTA.

Dissertation Erlangen 1980

12. HIERONYMUS, Ch.:

Prüfung einer Korrelation zwischen EDTA-hemmbarer
und nicht hemmbarer Serum-Paraoxonaseaktivität
bei 162 Vietnamesen.

Dissertation Erlangen 1981

13. HOFMEISTER, F.:

Über die Darstellung von kristallisiertem Eier-
albumin und die Kristallisierbarkeit kolloider
Stoffe.

Z. Physiol. Chem. 14, 165 - 171 (1890)

14. HOREJSI, J., SMETANA, R.:

The Isolation of Gamma Globulin from Blood-Serum
by Rivanol.

Acta Med. Scand. 155, 65 - 68 (1956)

15. JANDER, G., BLASIUS, E.:

Einführung in das organisch chemische Praktikum.

Verlag S. Hirzel, Stuttgart (1973)

16. KISTLER, P., NITSCHMANN, H.:

Vereinfachtes Verfahren zur Gewinnung von humanem Albumin und γ -Globulin aus Blutplasma mittels Alkoholfällung.

Helv. Chim. Acta 37, 866 - 873 (1954)

17. KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat durch menschliches Serum.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)

18. MARTON, A. V., KALOW, W.:

Inhibitors of aromatic esterase of human serum.

Biochem. Pharmacol. 3, 149 (1960)

19. ONCLEY, J. L., MELIN, M.:

The Separation of the Antibodies, Isoagglutinins, Prothrombin, Plasminogen and β_1 -Lipoproteins into Subfractions of Human Plasma.

J. Am. Chem. Soc. 71, 541 - 550 (1949)

20. OMURO, O.:

Serum-Paraoxonase-Polymorphismus in Japan.

Dissertation Erlangen 1980

21. POLSON, A., POTGIETER, G. M.:

The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight.

Biochim. Biophys. Acta 82, 463 - 475 (1964)

22. SCHEIFFARTH, F., GÖTZ, H.:

Vergleichende elektrophoretische und immunologische Untersuchungen an isoliertem γ -Globulin.

Z. Immunforsch. 115, 92 - 98 (1958)

23. SKRINJARIC-SPOLJAR, M., REINER, E.:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera.

Biochim. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Anregungen und für die große Hilfsbereitschaft die mir die Fertigstellung dieser Arbeit erleichterten.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die Übernahme des Korreferates.

LEBENS LAUF

Name	Görtler, Ralph
Geburtsdatum	26.09.1954
Geburtsort	Nürnberg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Vater	Görtler, Georg, Kaufmann
Mutter	Görtler, Gerda, geb. Adler
Schul Ausbildung	Sept. 1960 - Juli 1965 Volksschule Sept. 1965 - Juli 1974 Albrecht-Dürer-Gymnasium, Nürnberg
Studium	Wintersemester 1974/75 - Sommersemester 1976 Studium der Humanmedizin in Würzburg; Wintersemester 1976/77 - Sommersemester 1978 Studium der Humanmedizin in Erlangen; Wintersemester 1978/79 - Sommersemester 1981 Studium der Humanmedizin in Wien; Juni 1981 Abschlußexamen an der Universität Wien. August 1981 - Juli 1982 Medizinalassistent im Klinikum der Stadt Nürnberg. Approbation als Arzt im August 1982.

Druck: Offsetdruckerei Karl Döres, 8520 Erlangen, Jägerstr. 3, Inh. B. Lengenfelder